

LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE

HERAUSGEGEBEN VON DER
GESELLSCHAFT DEUTSCHER CHEMIKER

JAHRGANG 1983 · HEFT 10 · SEITE 1641 – 1844

Dieses Heft wurde am 14. Oktober 1983 ausgegeben

Nebenreaktion bei der Darstellung von Methionin-Enkephalin

*Wolfgang Voelter** und *Alexander Altenburg*

Abteilung für Physikalische Biochemie, Physiologisch-Chemisches Institut,
Hoppe-Seyler-Straße 1, D-7400 Tübingen

Eingegangen am 11. März 1983

Die alkalische Verseifung von Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe (**1**) führt auch bei Verwendung äquimolarer Mengen an Natronlauge zur Bildung von Harnstoffderivaten. Es wurde die Bildung der Nebenprodukte in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Der substituierte Harnstoff wurde charakterisiert und acidolytisch zu 5-(4-Hydroxybenzyl)-DL-hydantoin-3-essigsäure abgebaut.

A Side Reaction in the Synthesis of Methionine-Enkephalin

Alkaline saponification of Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe (**1**) leads to derivatives of urea even by the use of equimolar quantities of sodium hydroxide. Formation of by-products was investigated at different pH values. The urea derivative was characterized and acidolytically transformed into 5-(4-hydroxybenzyl)-DL-hydantoin-3-acetic acid.

1976 beschrieben wir die erste klassische Synthese von Methionin-Enkephalin¹⁾. Bei der Verseifung des entsprechenden geschützten Peptidesters Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe (**1**) werden Nebenprodukte beobachtet, die die Ausbeute um ca. 30 % verringern. Um diese Nebenreaktionen aufzuklären, wird das geschützte Peptid gemäß Schema 1 synthetisiert.

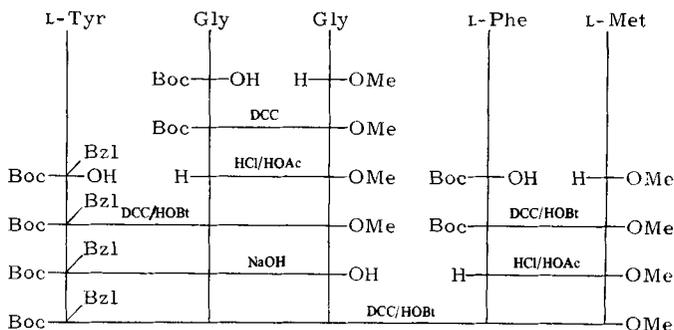
Trotz zweifachen Umkristallisierens des geschützten Pentapeptids **1** wird durch Dünnschichtchromatographie eine Verunreinigung nachgewiesen. Da die Oxidationsanfälligkeit methioninhaltiger Peptide wohl bekannt ist³⁻⁴⁾, wird mittels H₂O₂ das Sulfoxid des geschützten Pentapeptids hergestellt. Die R_F-Werte von Sulfoxid und Verunreinigung stimmen in verschiedenen Laufmitteln überein. Behandlung des Peptids mit Thioglycolsäure ändert das dünnschichtchromatographische Verhalten nicht. Nach

Liebigs Ann. Chem. 1983, 1641 – 1655

© Verlag Chemie GmbH, D-6940 Weinheim, 1983
0170 – 2041/83/1010 – 1641 \$ 02.50/0

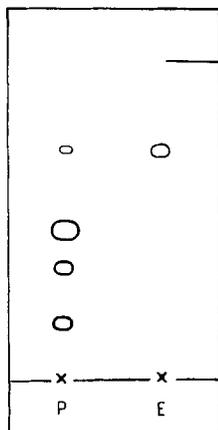
Durchführung der Dünnschichtchromatographie unter Stickstoff läßt sich jedoch kein Sulfoxid mehr nachweisen. Die Oxidation des Methionins tritt demnach während des Trenn- und Entwicklungsvorgangs ein.

Schema 1. Syntheschema von [Boc-Tyr¹(Bzl)]Methionin-Enkephalin-methylester (1)



Verseifung des durch die *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe geschützten Peptidesters 1

2 g [Boc-Tyr¹(Bzl)]Methionin-Enkephalin-methylester (1) werden analog Lit.²⁾ mit einem 10proz. Überschuß an 2 N NaOH verseift. Nach fünfständiger Reaktionszeit wird das Dünnschichtchromatogramm von Abb. 1 erhalten.



P = Produkt
E = Edukt

Abb. 1. Dünnschichtchromatogramm nach fünfständiger Verseifung von Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe (1) mit 2 N NaOH bei 25°C. Bedingungen: Kieselgelplatte 60 F₂₅₄, Laufmittel B, Anfärbung mit Chlortoluidin

In der ersten halben Stunde der Reaktion kommt es hauptsächlich zur Bildung der Substanzen 2 und 3. Im weiteren Verlauf bildet sich 4, während gleichzeitig die Konzentration von 1, 2 und 3 abnimmt. Alle 4 Flecken zeigen Chlortoluidin-Reaktion, während sich mit Ninhydrin nur die Flecken von 1 und 2 anfärben lassen. Durch mehrmalige Gelchromatographie der Reaktionsprodukte an Sephadex LH 20 (Laufmittel: CH₃OH) lassen sich 6 mg der Substanz 4 nahezu rein isolieren. Aus dem FD-MS-Spektrum wird eine Molekülmasse von 708 ermittelt. Die Aminosäureanalyse ist gegenüber dem geschützten Pentapeptid unverändert, und die Elementaranalyse unterscheidet

sich vom Ausgangsmaterial durch einen deutlich erniedrigten Gehalt an Wasserstoff und Kohlenstoff. Dies und das Ausbleiben einer Reaktion von **3** und **4** mit Ninhydrin weisen auf eine Umlagerung hin, wie sie vornehmlich für die Z-Gruppe, aber nicht für die Boc-Gruppe beschrieben ist. 1952 fanden *Wessely et al.*^{5,6}, daß bei der Behandlung Z-geschützter Peptide mit überschüssigem Alkali Harnstoffderivate gebildet werden. Durch Abspaltung von Alkohol kommt es zur intermediären Bildung eines Hydantoinderivates, das im alkalischen Medium instabil ist und zur Carbonylbis(aminosäure) gespalten wird. Da die Boc-Gruppe gegenüber der Z-Gruppe im alkalischen Milieu bedeutend stabiler ist⁷, sollte sie einen ausreichenden Schutz gegen entsprechende Umlagerungen bieten⁸. Das FD-MS-Spektrum (Abb. 2) der Substanz **4** läßt sich jedoch mit dem Carbonylbis(aminosäure)-Derivat *N*-[(1*R*,*S*)-2-(4-Benzoyloxyphenyl)-1-carboxyethylaminocarbonyl]glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl-DL-methionin (Bopce-NH-CO-Gly-Gly-Phe-Met-OH) in Einklang bringen.

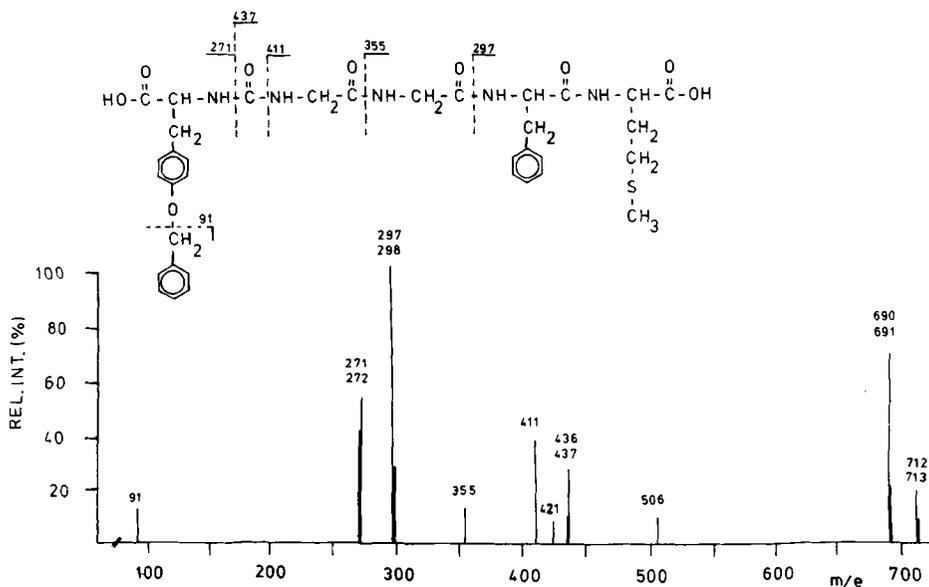


Abb. 2. FD-MS-Spektrum von Bopce-NH-CO-Gly-Gly-Phe-Met-OH (**4**) (Emitterheizstrom: 16 mA)

Das Signal bei $m/e = 712$ entspricht dem Mononatriumsalz, das Signal bei $m/e = 690$ entsteht durch Abspaltung von Wasser.

Gezielte Umlagerung von Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe (**1**) zu (Bopce-NH-CO-Gly-Gly-DL-Phe-DL-Met-OH (**4**))

Da die Reaktionsbedingungen zu weitgehender Racemisierung der Produkte führen, wird auf Konfigurationsangaben verzichtet.

2 g geschütztes Pentapeptid werden bei 40°C unter N₂ mit 3 Äquivalenten NaOH umgesetzt. Der Reaktionsverlauf wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Den numerierten Flecken des Dünnschichtchromatogramms lassen sich folgende Substanzen zuordnen:

- 1: Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OMe
- 2: Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OH
- 3: Bopce-NH-Co-Gly-Gly-Phe-Met-OMe
- 4: Bopce-NH-CO-Gly-Gly-Phe-Met-OH

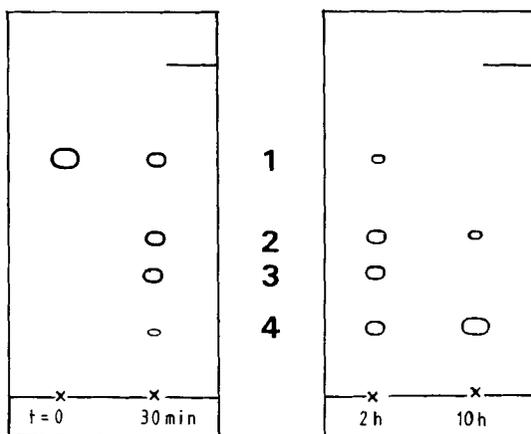
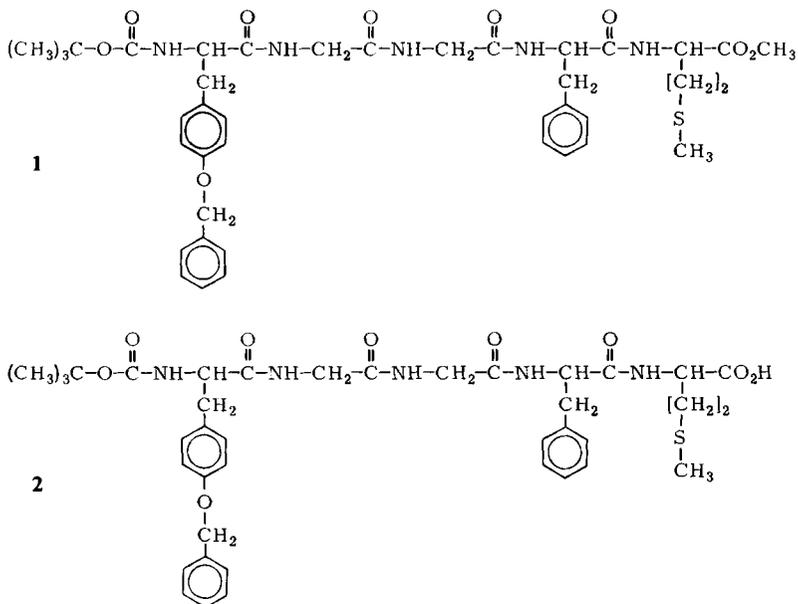
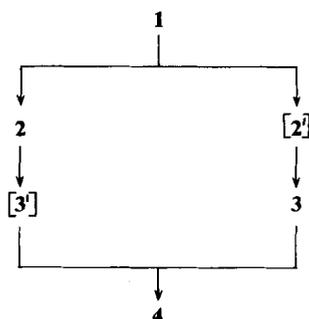
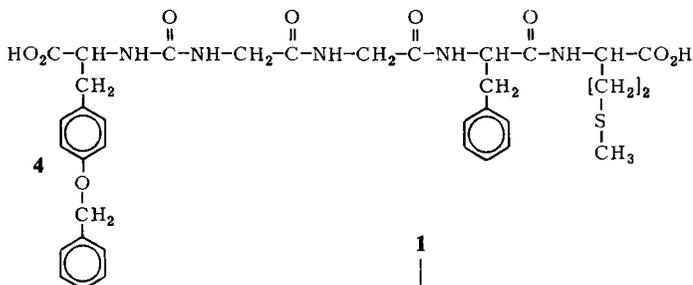
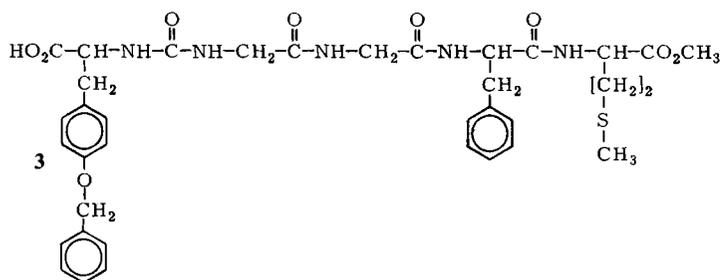
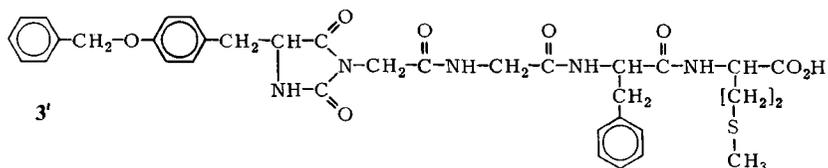
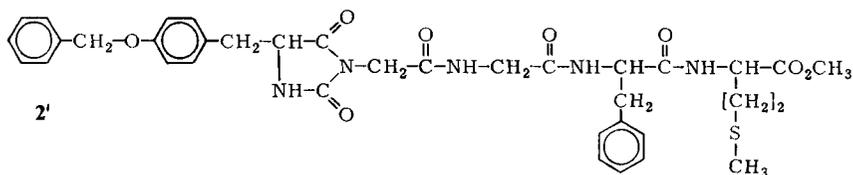


Abb. 3. Dünnschichtchromatographische Kontrollen der Umlagerung von [Boc-Tyr¹(Bzl)]-Methionin-Enkephalin-methylester (1) bei 40 °C mit drei Äquivalenten 2 N NaOH unter Stickstoff Bedingungen: Kieselgelplatte 60 F₂₅₄, Laufmittel B, Anfärbung mit Chlortoluidin

Schema 2. Reaktionsschema der Behandlung von Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OMe (1) mit überschüssigem Alkali. Bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C werden beide Wege zu annähernd gleichen Teilen beschriftet. Die fett gedruckten Ziffern entsprechen der Numerierung der DC-Flecken (vgl. Abb. 3).





Der Boc-geschützte Peptidester wird unter obigen Reaktionsbedingungen gleichermaßen zu 2 verseift und zu 3 umgelagert. Als Folgereaktion tritt eine Umlagerung von 2 zu 4 und eine Verseifung von 3 zu 4 ein. 2 reagiert nicht vollständig zu 4 weiter.

Die Zuordnung der Substanzen geschieht mit Hilfe von Vergleichssubstanzen über den R_F -Wert bei 2 und mit Hilfe spektroskopischer Methoden bei 4. Substanz 3 ergibt sich aus dem Reaktionsschema und negativem Verhalten gegenüber Ninhydrin. Ein Racemattest von Bocpe-NH-Co-Gly-Gly-Phe-Met-OH (4) zeigt, daß unter den gewählten Reaktionsbedingungen (10 h bei 40 °C) L-Tyrosin, L-Phenylalanin und L-Methionin weitgehend racemisieren.

Im ^{13}C -Spektrum (Abb. 4) fehlen, wie erwartet, die Signale der Boc-Gruppe. Das Carbonyl-C-Atom der Harnstoffgruppe ($\delta = 157.10$) ist gegenüber dem Carbonyl-C-Atom der Boc-Gruppe um 2 ppm zu tieferem Feld verschoben. Die Signalzuordnung in Abb. 4 erfolgt durch spektroskopischen Vergleich mit den Ausgangsmaterialien und mit Hilfe von Literaturdaten¹³⁾.

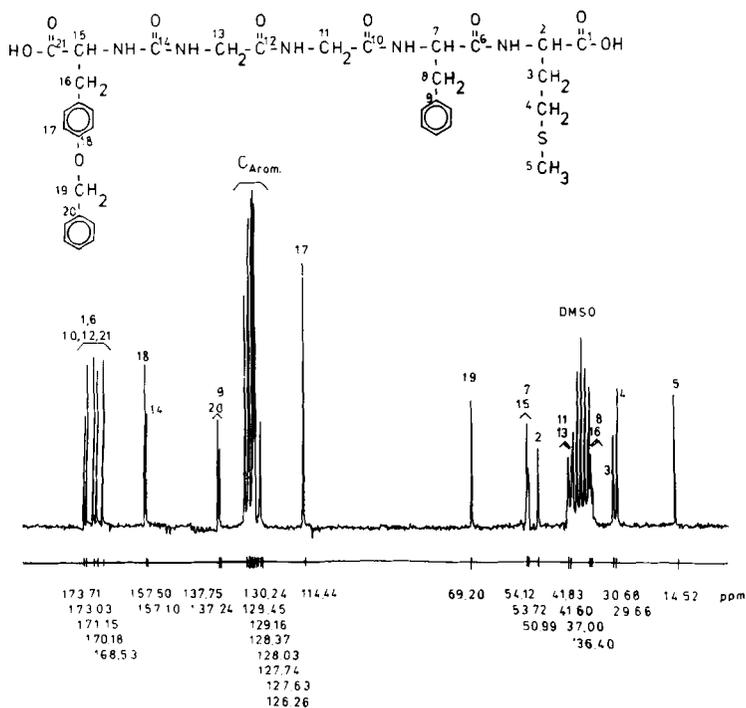


Abb. 4. ^{13}C -NMR-Spektrum von Bocpe-NH-CO-Gly-Gly-DL-Phe-DL-Met-OH (Breitbandentkopplung der Protonen, 22.63 MHz, 59 550 Pulsinterferogramme, 215 mg in 1 ml $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)

Der eliminierte *tert*-Butylalkohol wird durch gaschromatographische Analyse ermittelt.

Optimierungsversuche zur Verseifung von Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OME (1)

Um den Einfluß des pH-Werts auf die Reaktionsgeschwindigkeit von Verseifung und Umlagerung kennenzulernen, wird die alkalische Behandlung des geschützten Penta-peptids mit verschiedenen Konzentrationen an Lauge durchgeführt. Es zeigt sich, daß

teren Beweis für die angenommene Struktur **A** liefert das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum. Das Methinproton des Tyrosins zeigt ein komplexes Aufspaltungsmuster infolge Kopplung mit den diastereotopen Methylenprotonen und – wenn auch schwach – mit dem benachbarten Amidproton.

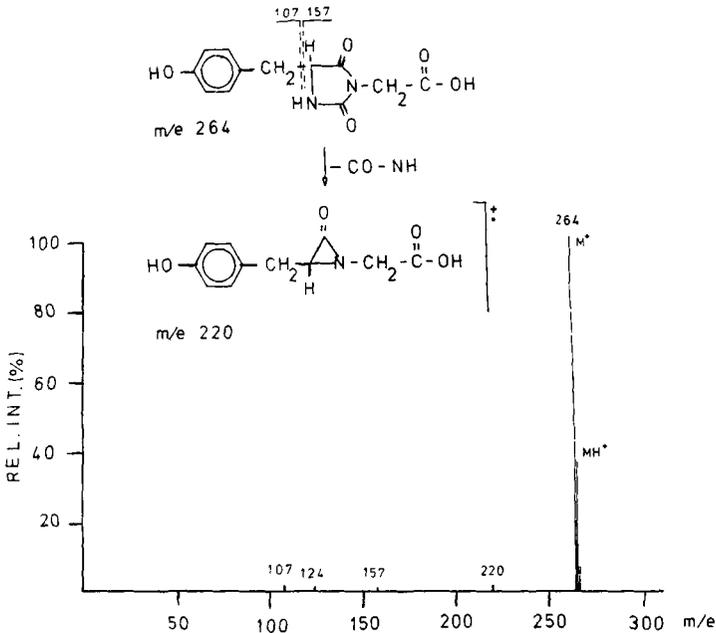
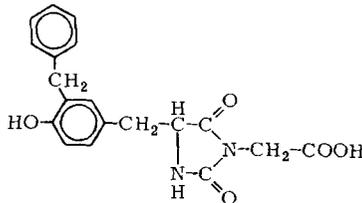


Abb. 5. FD-MS-Spektrum von 5-(4-Hydroxybenzyl)hydantoin-3-essigsäure (Emitterheizstrom: 11 mA)

Im ^{13}C -Spektrum sind die Signale der Carbonyl-C-Atome des 2,4-Imidazolidindions gegenüber unsubstituiertem Hydantoin um 5 (C-2) bzw. 2 (C-4) ppm hochfeldverschoben. Der Alkylkohlenstoff (C-5) ist um 11 ppm tieffeldverschoben und beweist die Substitution in 5-Stellung.



Bzl-A

Das bei der Acidolyse der Harnstoffderivate zu ca. 10% aufgetretene Nebenprodukt Bzl-A kann mittels Gelchromatographie isoliert werden. Die mittels FD-MS erhaltene Molekülmasse und die Elementaranalyse stimmen mit benzylierter 5-(4-Hydroxybenzyl)hydantoin-3-essigsäure überein. Die Veränderungen im Aromatenbereich im ^{13}C - und

^1H -Spektrum beweisen die C-Benzylisierung des Phenolrings. Ob die Substitution in 2- oder 3-Stellung erfolgt, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Für eine Benzylisierung des Phenolrings in *o*-Stellung zur OH-Gruppe spricht sowohl die sterische Hinderung durch den Hydantoinring als auch die im ^{13}C -Spektrum gegenüber 5-(4-Hydroxybenzyl)-hydantoin-3-essigsäure erkennbare Hochfeldverschiebung des mit der Hydroxygruppe verknüpften aromatischen C-Atoms um 3 ppm.

Diskussion

Bei der Verseifung von Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe (1) kommt es oberhalb von pH = 12.5 zur Bildung von Harnstoffderivaten. Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe läßt sich jedoch mit 2 N NaOH ohne Bildung von Nebenprodukten in kurzer Zeit verseifen. Nach *McClaren*¹⁰ sind Peptide mit Glycin an zweiter Stelle im Peptidverband besonders umlagerungsgefährdet. Dies wirkt sich beim geschützten Tripeptid aufgrund der hohen Carbonylaktivität der Estergruppe nicht aus. Beim Pentapeptid wird jedoch aufgrund der sehr geringen Reaktionsgeschwindigkeit der Esterverseifung die Bildung von Umlagerungsprodukten eine unmittelbare Konkurrenz- oder Folge-reaktion.

Experimenteller Teil

Abkürzungen: Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, Bopce = *N*-[(1*R*,*S*)-2-(4-Benzylphenoxyphenyl)-1-carboxyethyl], Bzl = Benzyl, DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, HOBt = 1-Hydroxybenzotriazol, DMF = Dimethylformamid, DMSO = Dimethylsulfoxid, EE = Essigsäure-ethylester, EtOH = Ethanol, FD-MS = Felddesorptions-Massenspektroskopie, HOAc = Essigsäure, MeOH = Methanol, PEE = Petrolether, Z = Benzylloxycarbonyl.

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren mit einem Apparat nach Totolli (Fa. Büchi) bestimmt und sind nicht korrigiert. – **Die optischen Drehwerte** wurden bei 20°C in einer 1-dm-Küvette mit einem Spektrographen 281 B der Fa. Perkin-Elmer gemessen. – ^{13}C -NMR-Spektroskopie: Die Aufnahme der ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte mit einem Bruker-HFX-90-Multikern-NMR-Spektrometer (22.63 MHz). Die δ -Werte sind auf DMSO als innerer Standard bezogen. – ^1H -NMR-Spektroskopie: die Aufnahme der ^1H -NMR-Spektren erfolgte mit einem Bruker-WP-80-NMR-Spektrometer. Als innerer Standard wurden die benutzten Lösungsmittel verwendet. – Infrarotspektroskopie: Für die Aufnahme der IR-Spektren wurden KBr-Preßlinge verwendet. Die Aufnahme erfolgte mit einem 281-B-Spektrometer der Fa. Perkin-Elmer. – Felddesorptions-Massenspektrometrie: Die FD-MS-Spektren wurden mit einem MAT-711-Spektrometer der Fa. Varian gemessen. – **Gaschromatographie:** Es wurde der Chromatograph Fractovap 2101 (FID-Detektor) der Fa. Carlo Erba sowie eine Glassäule (2 m \times 2 mm), gefüllt mit 3% OV 17 auf Chromosorb P AW DMCS, verwendet. – **Dünnschichtchromatographie:** Es wurden DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fa. Merck), benutzt. Als **Fließmittel** fanden Verwendung: 1-Butanol/Eisessig/Wasser, 3:1:1 (A) und Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser, 8:8:8:1 (B). Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrin- oder Chlortoluidinlösung mit anschließendem Erwärmen auf 110°C sichtbar gemacht. – **Gelchromatographie:** Die Trennungen wurden auf einer Säule (200 cm lang, \varnothing 3 cm) aus 300 g Sephadex LH 20 durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 254 nm. Racemattest: Die Trennung der derivatisierten D- und L-Aminosäuren erfolgte an Chirasil-Val.

tert-Butyloxycarbonyl-glycyl-glycin-methylester: 35.1 g (200 mmol) Boc-Gly-OH, 22.8 g (182 mmol) H-Gly-OMe \times HCl und 20 ml (182 mmol) *N*-Methylmorpholin werden in 360 ml DMF/CH₂Cl₂ (4:1) gelöst. Man kühlt auf -15°C und versetzt mit 37.5 g (182 mmol) DCC, das in CH₂Cl₂ gelöst und vorgekühlt wurde. Man rührt 2 h bei -15°C und erwärmt die Reaktionsmischung anschließend auf Raumtemp., bei der noch weitere 5 h gerührt wird. Nach 2stdg. Kühlen (0°C) wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und die Lösung eingedampft. Den Rückstand nimmt man mit EE auf, wäscht sauer sowie alkalisch, dampft ein und kristallisiert aus EtOH/Ether um; Ausb. 24.5 g (55%), Schmp. $45-47^{\circ}\text{C}$, $R_F(\text{B}) = 0.62$.

C₁₀H₁₈N₂O₅ (246.3) Ber. C 48.77 H 7.37 N 11.38 Gef. C 48.59 H 7.31 N 11.22

Glycyl-glycin-methylester-hydrochlorid: 20.5 g (78.8 mmol) Boc-Gly-Gly-OMe werden mit 250 ml 1.2 N HCl in Eisessig übergossen und 30 min gerührt. Danach wird eingedampft und aus EtOH/Ether umkristallisiert; Ausb. 13.5 g (94%), Schmp. 134°C (Lit. ¹⁾ 122°C), $R_F(\text{B}) = 0.12$.

C₅H₁₁ClN₂O₃ (182.6) Ber. C 32.89 H 6.07 Cl 19.41 N 15.34
Gef. C 32.52 H 6.29 Cl 18.56 N 15.12

tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-methionin-methylester: 39.8 g (150 mmol) Boc-L-Phe-OH, 23.6 g (145 mmol) H-L-Met-OMe und 20.3 g (150 mmol) HOBT werden in 250 ml DMF/CH₂Cl₂ (4:1) gelöst und bei -15°C mit 31.0 g (150 mmol) DCC versetzt, das in CH₂Cl₂ gelöst und vorgekühlt wurde. Man rührt 2 h bei -15°C und erwärmt die Reaktionsmischung anschließend auf Raumtemp., bei der noch weitere 5 h gerührt wird. Nach 2stdg. Kühlen (0°C) wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und die Lösung eingedampft. Den Rückstand nimmt man in Ether auf, wäscht sauer sowie alkalisch, dampft ein und kristallisiert aus Ether um; Ausb. 38.6 g (65%), Schmp. 153°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -21.07$ ($c = 1$, MeOH), $R_F(\text{B}) = 0.73$.

C₂₀H₃₀N₂O₅S (410.5) Ber. C 58.51 H 7.37 N 6.82 S 7.81
Gef. C 58.16 H 7.57 N 6.80 S 7.64

L-Phenylalanyl-L-methionin-methylester-hydrochlorid: 33.0 g (80.4 mmol) Boc-L-Phe-L-Met-OMe werden mit 250 ml 1.2 N HCl in Eisessig übergossen und 30 min gerührt. Danach wird eingedampft und aus MeOH, EE und Ether kristallisiert. Die Substanz kristallisiert in weichen, klebrigen Nadeln unter Einschluß einer größeren Menge an Lösungsmittel, das durch Evakuieren entfernt wird. Das schlechte Kristallisationsverhalten ist möglicherweise auf eine geringe Verunreinigung zurückzuführen, die mittels Dünnschichtchromatographie [$R_F(\text{B}) = 0.36$] nachgewiesen wurde. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um ein durch *tert*-Butylierung an der Thioether-Gruppe des Methionins entstandenes Sulfoniumsalz¹⁴); Ausb. 22.3 g (80%), Schmp. 125°C , $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.25$ ($c = 1$, MeOH), $R_F(\text{B}) = 0.61$.

C₁₅H₂₃ClN₂O₃S (346.9) Ber. C 51.94 H 6.68 Cl 9.24 N 8.08 S 10.22
Gef. C 51.28 H 7.11 Cl 10.24 N 7.95 S 9.19

tert-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin-methylester: 17.0 g (93 mmol) H-Gly-Gly-OMe \times HCl, 33.4 g (90 mmol) Boc-L-Tyr(Bzl)-OH, 9.4 g (93 mmol) *N*-Methylmorpholin und 12.6 g (93 mmol) HOBT werden in 250 ml DMF/CH₂Cl₂ (1:1) gelöst und bei -10°C mit 19.2 g (93 mmol) DCC versetzt, das in CH₂Cl₂ gelöst und vorgekühlt wurde. Man rührt 2 h bei -10°C und erwärmt die Reaktionsmischung anschließend auf Raumtemp., bei der noch weitere 5 h gerührt wird. Nach 2stdg. Kühlen bei 0°C wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und die Lösung eingedampft. Den Rückstand nimmt man in Ether auf, wäscht sauer sowie alkalisch, dampft ein und kristallisiert aus EE/PE; Ausb. 34.0 g (76%), Schmp. $111-112^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +13.63$ ($c = 1$, MeOH), $R_F(\text{B}) = 0.49$.

C₂₆H₃₃N₃O₇ (499.6) Ber. C 62.51 H 6.66 N 8.41 Gef. C 62.34 H 6.71 N 8.19

tert-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin: 26.0 g (52 mmol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe werden in 200 ml MeOH gelöst und mit 28 ml (56 mmol) 2 N NaOH versetzt. Nach 15 min. Rühren bei Raumtemp. ist die Reaktion beendet. Nach Ansäuern der Lösung mit 1 N HCl auf pH = 2 wird der Hauptteil des Methanols i. Vak. entfernt, die Lösung mit Wasser versetzt und mit EE extrahiert. Die EE-Phase wird getrocknet (Na₂SO₄), eingengt und der ölige Rückstand aus MeOH/Ether kristallisiert. Die Bildung von Harnstoffderivaten wurde nicht beobachtet; Ausb. 19.9 g (79%), Schmp. 150°C, $[\alpha]_D^{20} = +13.07$ ($c = 1$, MeOH), $R_F(B) = 0.26$.

C₂₅H₃₁N₃O₇ (485.5) Ber. C 61.84 H 6.45 N 8.65 Gef. C 61.53 H 6.41 N 8.65

tert-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin-methyl-ester (1): 10.4 g (30 mmol) H-L-Phe-L-Met-OMe × HCl und 17.4 g (35 mmol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OH werden nach Zugabe von 3.1 g (30 mmol) *N*-Methylmorpholin in 200 ml DMF gelöst und bei -10°C mit 4.7 g (35 mmol) HOBt und 7.2 g (35 mmol) DCC (beides in DMF gelöst und vorgekühlt) versetzt. Nach 2stdg. Rühren bei -10°C erwärmt man die Lösung auf Raumtemp., bei der noch weitere 5 h gerührt wird. Nach 2stdg. Kühlen bei 0°C wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und die Lösung eingedampft. Saures und alkalisches Waschen läßt sich wegen der geringen Löslichkeit des Produkts in EE nicht durchführen. Da jedoch Umkristallisation aus DMF/MeOH möglich ist, verbleiben alle Verunreinigungen in Lösung und man erhält ein reines Produkt; Ausb. 16.0 g (60%), Schmp. 178–179°C, $[\alpha]_D^{20} = -20.30$ ($c = 1$, DMF) (Lit.²⁾ Schmp. 155–158°C, $[\alpha]_D^{20} = +7.8$, MeOH), $R_F(B) = 0.69$. FD-MS (Emitterheizstrom: 11 mA): $m/e = 779$ (30%, MH⁺), 778 (100%, M⁺), 91 (35%). – Aminosäureanalyse (Totalhydrolyse in 6 N HCl, 110°C, 16 h):

Ber. Tyr 1.00 Gly 2.00 Phe 1.00 Met 1.00

Gef. Tyr 0.56 Gly 0.81 Phe 1.00 Met 0.87

C₄₀H₅₁N₅O₉S (777.9) Ber. C 61.76 H 6.61 N 9.00 S 4.12

Gef. C 61.25 H 6.55 N 8.92 S 4.57

tert-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (2). – *Optimierungsversuche zur Verseifung von 1* (Alle Reaktionen werden unter N₂ durchgeführt).

a) *Verseifung mit 0.02 N NaOH (pH = 12.3) und 10proz. Überschuß an Lauge*: 100 mg (0.128 mmol) Ester werden in 2 ml DMF gelöst und stündlich mit 0.7 ml (0.013 mmol) 0.02 N NaOH versetzt. Nach der 10. Zugabe wird noch weitere 10 h gerührt. Um ein Ausfallen des Peptids zu verhindern, müssen weitere 4 ml DMF zugegeben werden. Ergebnis: Der Ester läßt sich zu ca. 90% verseifen, Umlagerung zu Harnstoffderivaten tritt nicht auf.

b) *Verseifung mit 0.2 N NaOH (pH = 13.3)*: 100 mg (0.128 mmol) Ester werden in 2 ml DMF gelöst und stündlich mit 0.07 ml (0.013 mmol) 0.2 N NaOH versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 h wird die Reaktion aufgrund der Bildung von Harnstoffderivaten abgebrochen. Ergebnis: Bei pH = 13.3 tritt die Umlagerung zu Harnstoffderivaten als Konkurrenzreaktion zur Esterverseifung auf.

c) *Verseifung mit 0.1 N NaOH (mit einem pH-Stat-Gerät)*: 1.0 g (1.28 mmol) Ester **1** werden in 15 ml DMF gelöst. Am pH-Stat-Gerät wird ein anfänglicher Verbrauch an 0.1 N NaOH von 2 Tropfen/min eingestellt (pH = 13). Nach einer Reaktionszeit von 9 h wird die Reaktion aufgrund der Bildung von Harnstoffderivaten abgebrochen. Der pH-Wert wird auf 2 eingestellt, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand in DMF aufgenommen und das Produkt mit Wasser gefällt. Ergebnis: Das Rohprodukt enthält ca. 5% Ester. Mittels Gelchromatographie (Säule: 200 cm lang, Ø 2.5 cm, Sephadex LH 20, MeOH) unter N₂ wird eine weitgehende Reinigung erzielt, die Ausb. sinkt jedoch um 50%. Das gereinigte Produkt enthält ca. 1% Ester; Ausb. 390 mg (40%), Schmp. 171–173°C, $[\alpha]_D^{20} = -15.40$ ($c = 1$, DMF) (Lit.²⁾ Schmp. 175°C, $[\alpha]_D^{25} = -12.4$, $c = 0.9$, DMF), $R_F(B) = 0.5$. – Racemattest: D-Tyr 11.6%, D-Phe 8.6%, D-Met

25.2%. – FD-MS (Emitterheizstrom: 14 mA): $m/e = 765$ (50%, MH^{\oplus}), 764 (100%, M^{\oplus}), 665 (20%), 664 (56%).

$\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}$ (763.9) Ber. C 61.32 H 6.47 N 9.17 S 4.20
Gef. C 60.97 H 6.37 N 8.68 S 4.52

O-Benzyl-*L*-tyrosyl-glycyl-glycyl-*L*-phenylalanyl-*L*-methionin-methylester-hydrochlorid: 1.0 g (1.28 mmol) **1** wird unter N_2 mit 10 ml 1.2 N HCl in Eisessig übergossen und 20 min gerührt. Das Ausgangsprodukt löst sich im Lauf der Reaktion vollständig. Man dampft ein und kristallisiert aus MeOH/Ether. Das erhaltene Produkt enthält in sehr geringen Mengen eine Verunreinigung, die vermutlich durch *tert*-Butylierung an der Thioether-Gruppe des Methionins entsteht¹⁴). Durch wiederholte Gelchromatographie (Säule: 200 cm lang, \varnothing 3 cm, Sephadex LH 20, MeOH) unter N_2 kann das Produkt sauber erhalten werden. Der Ausbeuteverlust beträgt ca. 30%; Ausb. 620 mg (68%), Schmp. 169–171 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -28.60$ ($c = 1$, DMF), $R_{\text{F}}(\text{B}) = 0.6$.

$\text{C}_{35}\text{H}_{44}\text{ClN}_5\text{O}_7\text{S}$ (714.3) Ber. C 58.85 H 6.21 Cl 4.96 N 9.80 S 4.49
Gef. C 58.35 H 6.74 Cl 5.24 N 9.61 S 4.12

O-Benzyl-*L*-tyrosyl-glycyl-glycyl-*L*-phenylalanyl-*L*-methionin-hydrochlorid: 400 mg (0.56 mmol) des zuvor erwähnten Tyr(Bzl)-Gly-Gly-*L*-Phe-*L*-Met-OMe \times HCl werden unter N_2 in 7 ml MeOH gelöst und im Verlauf von 4 h portionsweise mit insgesamt 3 ml (1.5 mmol) 0.5 N NaOH versetzt. Der 50proz. Überschuß an Lauge ist nötig, um einen vollständigen Umsatz zu erreichen. Nach 6 h ist die Reaktion beendet. Die Lösung wird mit 1 N HCl auf pH = 2 gebracht, eingedampft, der Rückstand mit heißem EtOH ausgezogen und aus EtOH/*tert*-Butylalkohol/Ether kristallisiert; Ausb. 310 mg (80%), Schmp. 179–181 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +16.2$ ($c = 1$, MeOH), $R_{\text{F}}(\text{B}) = 0.32$. – Racemattest: *D*-Tyr 9.0%, *D*-Phe 7.6%, *D*-Met 15.2%. – Aminosäureanalyse: (Totalhydrolyse in 6 N HCl, 110 °C, 16 h):

Ber. Tyr 1.00 Gly 2.00 Phe 1.00 Met 1.00
Gef. Tyr 0.62 Gly 1.68 Phe 1.00 Met 0.91

$\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{ClN}_5\text{O}_7$ (700.3) Ber. C 58.32 H 6.05 Cl 5.06 N 10.00 S 4.58
Gef. C 57.69 H 5.97 Cl 4.61 N 9.72 S 3.86

Basenkatalysierte Umlagerung von Boc-Peptid-Estern zu Harnstoffderivaten

N-[(1*R*,*S*)-2-(4-Benzoyloxyphenyl)-1-carboxyethylaminocarbonyl]glycyl-glycyl-*DL*-phenylalanyl-*DL*-methionin (**4**): 1.0 g (1.3 mmol) **1** wird unter N_2 in 15 ml DMF gelöst und mit 3 ml (6 mmol) 2 N NaOH versetzt. Nach 10stdg. Rühren bei 50 °C wird die Lösung mit 1 N HCl auf pH = 2 gebracht und das Produkt durch Zusatz von Wasser ausgefällt. Nach Umkristallisation aus Methanol ist das Produkt dünnschichtchromatographisch rein; Ausb. 0.64 g (70%), Schmp. 165–167 °C, $R_{\text{F}}(\text{B}) = 0.23$. – Racemattest: *D*-Tyr 43.5%, *D*-Phe 38.2%, *D*-Met 46.7%. – FD-MS (Emitterheizstrom: 10 mA): $m/e = 710$ (65%, MH_2^{\oplus}), 709 (90%, MH^{\oplus}), 708 (100%, M^{\oplus}). – FD-MS (Emitterheizstrom: 16 mA): $m/e = 713$ (10%), 712 (20%), 691 (22%), 690 (75%), 506 (10%), 437 (30%), 436 (9%), 421 (8%), 411 (40%), 355 (12%), 298 (30%), 297 (100%), 272 (58%), 271 (43%), 91 (12%). – Aminosäureanalyse (Totalhydrolyse in 6 N HCl, 160 °C, 16 h):

Ber. Tyr 1.00 Gly 2.00 Phe 1.00 Met 1.00
Gef. Tyr 0.34 Gly 1.52 Phe 1.00 Met. 0.83

$\text{C}_{35}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}$ (707.8) Ber. C 59.39 H 5.84 N 9.89 S 4.52
Gef. C 59.26 H 6.39 N 9.98 S 4.82

N-[(1*R*,*S*)-2-(4-Benzoyloxyphenyl)-1-carboxyethylaminocarbonyl]glycyl-glycin und *N*-[(1*R*,*S*)-2-(4-Benzoyloxyphenyl)-1-carboxyethylaminocarbonyl]glycin: 1.0 g (6 mmol) Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe wird unter N_2 mit 5 ml 1 N NaOH übergossen und 2 h bei 100 °C gerührt. Danach wird

der pH-Wert mit 1 N HCl auf 2 gebracht, das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand mit heißem EtOH ausgezogen und durch Zugabe von Ether kristallisiert. Das Rohprodukt besteht aus dem Glycyl-glycin- und Glycin-Derivat im Verhältnis von 2:1. Die Trennung erfolgt durch Gelchromatographie [Säule: 200 cm lang, Ø 3 cm, Sephadex LH 20, MeOH/HOAc (19:1), Durchflußrate: 35 ml/h, Retentionszeit: 38 h].

Bopce-NH-CO-Gly-Gly-OH: Ausb. 410 mg (48%), Schmp. 185–186°C, $R_F(A) = 0.49$. – $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): $\delta = 2.75\text{--}3.20$ (m, CH_2 , Tyr), 3.80 (s, CH_2 , Gly), 3.91 (s, CH_2 , Gly), 4.52 (mc, CH, Tyr), 5.03 (s, CH_2 , Bzl), 6.83–7.37 (2m, 9 Aryl-H).

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7$ (429.4) Ber. C 58.74 H 5.40 N 9.79 Gef. C 58.02 H 5.55 N 9.41

Bopce-NH-CO-Gly-OH: Ausb. 180 mg (25%), Schmp. 168–170°C, $R_F(A) = 0.63$. – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{Aceton}$): $\delta = 2.83\text{--}3.38$ (m, CH_2 , Tyr), 3.91 (d, CH_2 , Gly), 4.62 (mc, CH, Tyr), 6.85–7.45 (2m, 9 Aryl-H).

$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ (372.4) Ber. C 61.28 H 5.41 N 7.52 Gef. C 60.69 H 4.98 N 7.43

Acidolyse von Harnstoffderivaten

5-(4-Hydroxybenzyl)-DL-hydantoin-3-essigsäure (A) aus **4**: 0.5 g (0.71 mmol) **4** werden unter N_2 in 15 ml 6 N HCl suspendiert und 2 h bei 100°C gerührt. Die Lösung wird eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und anschließend ein in ca. 2proz. Ausb. anfallendes Nebenprodukt durch Extrahieren mit Ether abgetrennt (s. unten). Danach wird zweimal mit EE ausgeschüttelt, getrocknet (Na_2SO_4) und eingeeengt. Das Produkt kristallisiert im Kühlschrank aus und ist dünnschichtchromatographisch rein; Ausb. 31 mg (16%), Schmp. 219–221°C (Lit.¹⁵) 218–221°C), $R_F(A) = 0.58$. – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{Aceton}$): $\delta = 2.71\text{--}3.28$ (m, CH_2 , Tyr), 4.03 (s, CH_2 , Gly), 4.33 (mc, CH, Tyr), 6.80 (mc, 5 Aryl-H), 7.13 (s, OH). – FD-MS (Emitterheizstrom: 11 mA): $m/e = 265$ (38%, MH^{\oplus}), 264 (100%, M^{\oplus}), 220 (1%), 157 (1.5%), 124 (1.5%), 107 (2.5%). – Aminosäureanalyse (Totalhydrolyse in 6 N HCl, 160°C, 16 h):

Ber. Tyr 1.00 Gly 1.00 Gef. Tyr 0.76 Gly 1.00

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_5$ (264.2) Ber. C 54.55 H 4.58 N 10.60 Gef. C 54.22 H 4.31 N 10.41

5-(3-Benzyl-4-hydroxybenzyl)-DL-hydantoin-3-essigsäure (Bzl-A): Die bei der Herstellung von **A** angefallene Ether-Phase wird eingeeengt, im Hochvakuum bei 60°C von Benzylchlorid befreit und der ölige Rückstand mittels Gelchromatographie (vgl. Bopce-NH-CO-Gly-Gly-OH) gereinigt. Da das Produkt nicht kristallisiert, wird es aus *tert*-Butylalkohol lyophilisiert; Ausb. 45 mg (5%), Schmp. 130–150°C, $R_F(A) = 0.62$. – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{Aceton}$): $\delta = 2.68, 3.25$ (m, CH_2 , Tyr), 3.92 (s, CH_2 , Gly), 3.98 (s, CH_2 , Bzl), 4.38 (m, CH, Tyr), 6.70–7.18 (2m, 8 Aryl-H), 7.18 (s, OH).

$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$ (354.4) Ber. C 64.40 H 5.12 N 7.91 Gef. C 63.82 H 5.15 N 8.00

Tab. 1. Schmelzpunkte und optische Drehwerte der synthetisierten Zwischenstufen verglichen mit den entsprechenden Literaturangaben

Aminosäurederivat	Schmp. [°C]		Gefunden	$[\alpha]_D^{20}$	Literaturbefund
	Gefunden	Literaturbefund			
Boc-Gly-OH	87	94 ¹¹⁾	–	–	–
H-Gly-OMe × HCl	180	175 ¹²⁾	–	–	–
Boc-L-Tyr(Bzl)-OH	109–110	108–110 ²⁾	+15.5 (c = 1, MeOH)	+16.3 (c = 1, MeOH) ²⁾	
Boc-L-Phe-OH	86	84–86 ¹¹⁾	+20.7 (c = 1, MeOH)	–4.0 (c = 1, HOAc) ¹¹⁾	
H-L-Met-OMe × HCl	146	145–146 ¹⁷⁾	+26.7 (c = 1, H ₂ O)	+26.8 (c = 5, H ₂ O) ¹⁷⁾	

Tab. 2. ^{13}C -NMR-Daten der synthetisierten Verbindungen (δ -Werte bezüglich $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)
I = Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly, **II** = L-Phe-L-Met-OMe \times HCl, **III** = Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-Met-OMe (**I**), **IV** = Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-Met-OH \times HCl, **V** = Bopce-NH-CO-Gly-Gly-DL-Phe-DL-Phe-DL-Met-OH (**4**), **VI** = Bopce-NH-CO-Gly-Gly-OH, **VII** = Bopce-NH-CO-Gly-OH, **VIII** = Hydantion **A**, **IX** = Hydantion Bzl-**A**

		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	
Tyr ¹	α	55.87		55.88	54.01	54.12	54.17	53.94	58.83	57.57	
	β	35.80		36.62	36.72	36.40	36.88	36.71	36.28	35.24	
	γ	— a)		— a)	— a)	— a)	— a)	— a)	125.83	— a)	
	δ	— a)		— a)	— a)	— a)	— a)	— a)	130.98	— a)	
	ϵ	114.37		114.31	114.77	114.44	114.54	114.51	115.52	114.81	
	ζ	156.88		156.82	157.50	157.10	157.10	157.12	156.76	153.63	
Gly ²	α	41.90		42.06	42.23	41.83	40.58	41.26	38.86	39.61	
Gly ³	α	41.85		41.80	41.95	41.60	42.57				
Phe ⁴	α		53.08	53.54	54.01	53.72					
	β		36.38	36.62	37.40	37.00					
	γ		134.85	137.19	137.19	137.24					
	δ		129.45	— a)	— a)	— a)					
	ϵ		128.15	— a)	— a)	— a)					
	ζ		126.72	— a)	— a)	— a)					
Met ⁵	α		50.94	50.93	51.33	50.99					
	β		30.46	30.42	30.80	30.86					
	γ		29.30	29.43	29.77	29.66					
	δ		14.35	14.48	14.58	14.52					
C=O		168.97	167.93	168.19	168.53	168.53	170.18	172.09	169.00	168.63	
Aminosäure		170.79	171.25	168.91	168.88	170.18	171.15	173.62	174.15	173.12	
		171.83		170.99	170.98	171.15	173.82				
				171.77	171.21	173.03					
Aromat. C-Atome		127.37		126.07	126.26	126.26	127.63	127.50		125.38	
		127.57		127.31	127.29	127.63	128.42	127.62		125.67	
		128.22		127.50	127.63	127.74	129.56	128.23		126.75	
		130.17		127.89	127.80	128.03	130.30	129.50		127.88	
				128.15	128.03	128.37	130.70	130.17		128.11	
				129.00	128.42	129.16				128.40	
				130.04	129.28	129.45				130.27	
				130.17	130.70	130.24				131.29	
	Boc-Gruppe	Me-	28.00		27.93						
		(Me) ₃ C-	78.12		78.04						
—CO—		155.13		155.00							
Me-Ester	—OMe		51.78	51.72							
Benzyl- gruppe	—CH ₂ —	69.20		69.14	69.20	69.20	69.20	69.18		36.14	
	Aromat. C ₁	137.12		137.51	137.87	137.75	137.24	137.20		141.13	
Harnstoff- gruppe	C=O					157.50	157.38	157.23	156.98	156.07	

a) Diese Signale sind ohne Zuordnung unter „Aromat. C-Atome“ aufgeführt.

- 1) *W. Voelter, C. Bürvenich, H. Horn, H. Kalbacher* und *E. Pietrzik*, *Angew. Chem.* **88**, 332 (1976); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **15**, 297 (1976).
- 2) *W. Voelter, H. Kalbacher* und *E. Pietrzik*, *Liebigs Ann. Chem.* **1977**, 609.
- 3) *G. I. Tesser* und *R. Schwyzer*, *Helv. Chim. Acta* **49**, 1013 (1966).
- 4) *B. Iselin*, *Helv. Chem. Acta* **44**, 61 (1961).
- 5) *F. Wessely, K. Schlögl* und *G. Korger*, *Monatsh. Chem.* **83**, 1156 (1952).
- 6) *F. Wessely, K. Schlögl* und *E. Wawersich*, *Monatsh. Chem.* **83**, 1426 (1952).
- 7) *G. W. Anderson*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **88**, 676 (1960).
- 8) *K. N. Deimer* in *Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller)*, B. XV/1, S. 336, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart 1974.
- 9) *E. Ware*, *Chem. Rev.* **46**, 403 (1950).
- 10) *J. McClaren*, *Aust. J. Chem.* **11**, 360 (1958).
- 11) *E. Schnabel*, *Liebigs Ann. Chem.* **702**, 188 (1967).
- 12) *T. Curtis* und *F. Goebel*, *J. Prakt. Chem.* **37**, 150 (1888).
- 13) *A. Khaled* und *D. W. Urry*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1979**, 1693.
- 14) *P. Sieber, B. Riniker, M. Brugger, B. Kumber* und *W. Rittel*, *Helv. Chim. Acta* **53**, 2135 (1970).
- 15) *T. B. Johnson* und *D. A. Hahn*, *J. Am. Chem. Soc.* **39**, 1255 (1917).
- 16) *G. Rücker, P. N. Natarajan* und *A. F. Fell*, *Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.* **304**, 883 (1971).
- 17) *M. Brenner* und *W. Pfisterer*, *Helv. Chim. Acta* **34**, 2085 (1951).

[68/83]